

액체 크로마토그래피 질량분석법을
이용한 24시간 요 중 유리 코르티솔
측정

연세대학교 대학원

의 학 과

구 현 민

액체 크로마토그래피 질량분석법을
이용한 24시간 요중 유리 코르티솔
측정

지도교수 김정호

이 논문을 석사 학위논문으로 제출함

2014 년 12 월

연세대학교 대학원

의 학 과

구 현 민

구현민의 석사 학위논문을 인준함

심사위원 김 정 호 인

심사위원 정 응 윤 인

심사위원 이 유 미 인

연세대학교 대학원

2014 년 12 월

감사의 글

본 논문을 완성함에 있어 시종일관 자상한 지도로 이끌어 주신 김정호 선생님께 진심으로 감사드리며, 바쁘신 중에도 아낌없는 조언으로 격려해 주신 정웅윤 선생님, 이유미 선생님께도 깊은 감사를 드립니다. 또한 실험에 많은 조언을 해주신 이상국 선생님께 감사를 드립니다.

연구기간 중 여러모로 배려해 주신 진단검사의학과 의국원 여러분께도 감사를 표합니다. 오늘이 있기까지 항상 염려해 주시고 이끌어 주신 가족과 이 기쁨을 함께 하고자 합니다.

저자 씀

<차례>

국문요약.....	1
I. 서론.....	3
II. 재료 및 방법.....	6
1. LC-MS/MS.....	6
2. 검사평가.....	7
3. 상관성 및 일치도 평가.....	8
4. Interference 평가.....	9
III. 결과	9
IV. 고찰.....	15
V. 결론.....	22
참고문헌.....	23
부록.....	28
ABSTRACT.....	48

그림 차례

그림 1. Comparison of evaluated method and LC-MS/MS in ARUP.....	13
그림 2. Comparison of evaluated method and CLIA by DxI.....	14
그림 3. Evaluation of loss of extraction for urinary free cortisol.....	20

표 차례

표 1. MS/MS instrument parameter.....	9
표 2. Within-day precision.....	10
표 3. Between-day precision.....	10
표 4. Evaluation of accuracy.....	11
표 5. Evaluation of matrix effect.....	11
표 6. Evaluation of process efficiency.....	11
표 7. Evaluation of stability.....	12
표 8. Evaluation of Lower Limit of Detection, Limit of Quantification	13
표 9. Evaluation of interference of prednisolone.....	15
표 10. Measurements of Urinary Free Cortisol (UFC) of patients with iatrogenic Cushing's syndrome by three methods.....	21

국문요약

액체 크로마토그래피 질량분석법을 이용한

24시간 요중 유리 코르티솔 측정

서론 국내에서는 쿠싱 증후군을 진단하기 위한 검사 중 24시간 요중 유리 코르티솔을 측정하기 위하여 주로 면역측정법을 사용해왔다. 그러나 이 방법은 교차반응이 일어나거나 정확도가 떨어지는 등의 단점이 있어 액체 크로마토그래피 질량분석법(LC-MS/MS)을 이용하여 24시간 요중 유리 코르티솔(Urinary Free Cortisol, UFC)을 개발하여 이 검사법을 평가하였다.

재료 및 방법 본 연구에서는 3가지 농도의 정도관리물질을 만들어 하루 8회 측정하여 LC-MS/MS 에 의한 UFC 의 일내 정밀도를 평가하였고 20일간 일간정밀도를 평가하였다. 표준물질을 이용하여 정확도를 검증하였고 추출하지 않은 분석표준 물질용액의 측정값으로 공 시료만 추출한 후 분석표준물질을 첨가하여 구한 측정값을 비교하여 매트릭스 효과를 평가하였으며 상온과 냉장에서 5일간 보관하여 검체 안정도를 평가하였고, 검출한계, 정량한계 역시 검증하였다. 상관성을 평가하기 위해 45명의 24시간 요 환자 검체를 이용하여 미국 ARUP 검사실의 액체 크로마토그래피 질량분석법 및 본 검사실의 화학발광면역측정법과 비교하였으며 프

레드니솔론에 대한 교차반응성을 평가하기 위해 프레드니솔론이 첨가된 검체를 측정하였다.

결과 LC-MS/MS 에 의한 UFC 의 일내 정밀도와 일간 정밀도 모두 10% 미만이었고 정확도는 5% 미만으로 검증되었다. 매트릭스 효과는 5% 미만이었고 검체 안정도 역시 한 검체를 제외하면 예상 값의 5% 이내였다. 1 ng/ml에서 검출한계, 정량한계가 검증되었다. ARUP 검사실과 비교하여 37%의 양성 비례오차가 있었으나 상관성은 우수하였고($y = 1.37x + 0.19$, $r = 0.999$). NIST 표준액 기준으로 정확도 평가에서 허용범위 내 수준이라 임상적으로 활용이 가능하다고 판단되었다. LC-MS/MS 에 의한 UFC 의 프레드니솔론에 대한 교차반응성은 화학발광면역측정법보다 우수하였다.

결론 액체 크로마토그래피 질량분석법은 좋은 정밀도, 민감도 및 정확성을 보이고 프레드니솔론에 대한 특이도가 높아서 쿠싱 증후군을 진단하는 데에 유용할 것이라 판단되었다.

핵심 되는 말: 액체 크로마토그래피 질량분석법, 요중 유리 코르티솔, 쿠싱 증후군

액체 크로마토그래피 질량분석법을 이용한

24시간 요중 유리 코르티솔 측정

<지도교수 김정호>

연세대학교 대학원 의학과

구현민

I. 서론

쿠싱 증후군(Cushing's syndrome)은 부신에서 생성되는 코르티솔(cortisol) 호르몬의 과도한 노출로 인해 발생하는 질병이다. 원인으로는 당질코르티코이드(glucosteroid) 약물의 영향이나 과도한 코르티솔, 부신 피질 자극 호르몬(adreno-corticotrophic hormone), 부신 피질 자극 호르몬 방출 호르몬(Corticotropin-releasing hormone)의 분비 등이 대표적이며^{1,4} 백만 명당 0.7-6명 정도에서 발병하며 높은 사망률을 보이기 때문에 질환을 조기 진단하여 치료하는 것이 중요하다^{5,6}. 그러나 발현되는 증상이 비만, 고혈압, 월경불순, 그리고 포도당 불내성과 같이

비특이적이기 때문에⁷ 생화학적 검사를 이용하여 쿠싱 증후군을 진단하여야 한다. 하지만 쿠싱 증후군을 진단하기 위해서 환자에게서 코르티솔이 과도한 양이 분비되는지를 측정하여야 하는데 코르티솔은 혈중에서 활동일주기(circadian rhythm)을 가지기 때문에⁸ 한번의 채혈이나 채뇨로는 코르티솔이 증가되었는지 알기 어렵다⁹. 2008년 내분비학회 임상지침(Endocrine society clinical guideline)에 따르면 쿠싱 증후군을 진단하기 위한 우선 검사(first line test)로 24시간 요중 유리 코르티솔(urinary free cortisol, UFC), 저용량 텍사메타존 억제 검사(low-dose dexamethasone suppression tests), 그리고 심야 타액 코티솔(late night salivary cortisol)를 꼽았다^{10,11}. 이중 24시간 요중 유리 코르티솔을 측정하는 방법으로 현재 국내에서는 면역 분석법 (immunoassay) 방법이 널리 쓰이고 있는데¹² 면역 분석법은 cortisol-3-(o-carboxymethyl)-oxime 결합을 인식하는 항체를 이용한 것이기 때문에 교차반응(cross-reaction)이 일어나 다른 스테로이드나 스테로이드 대사물, 이를테면 프레드니솔론(prednisolone), ring-A 코르티솔 대사물, dihydrocortisol, tetrahydrocortisol 등에 방법에 따라 양성 오차 (2.5-60%)를 가진다^{13,14,15}. 또한 검사 기기마다 결과가 달라지는 경우가 많은데 실제로 13명의 정상인에게 당질코르티코이드를 1회 흡입량만큼 투여한 후 다른 4가지 기기로 기저 소변 코르티솔 배출량(basal urinary cortisol excretion)을 측정하였더니 100% 증가된 측정치부터 62% 감소된 측정치까지 다양한

결과를 보인 보고가 있었다¹⁶. 그렇기에 이러한 오차를 줄이기 위해 액체-액체 추출(liquid-liquid extraction) 등의 방법이 흔히 사용되었지만 검사시간이 많이 소모되며 카바마제핀(carbamazepine)을 복용하는 환자의 경우 알려지지 않은 대사물이 생성되거나¹⁷ 고성능 액체크로마토그래피 고정상(HPLC column)에서 동시 용출(co-elution)이 일어나는 것에 의해서 오차가 여전히 존재할 뿐만 아니라 내부표준물질(internal standard)의 부재로 인해 결과 값의 재현성이 좋지 못한 등의 단점이 있었다¹⁸. 이에 분석적 간섭(analytical interference)를 줄이고 정확도(accuracy)를 증가시켰으며 분석시간을 줄인, 기존의 단점들이 보완된 요중 유리 코르티솔 측정방법으로 액체 크로마토그래피 질량분석법(liquid chromatography–tandem mass spectrometry, LC–MS/MS) 법이 제안되었다¹⁸. 본 연구에서는 액체 크로마토그래피 질량분석법을 이용해 요중 유리 코르티솔을 측정하는 방법을 정립하고 실제로 측정하여 해외의 액체 크로마토그래피 질량분석법을 이용하여 요중 유리 코르티솔을 보고하고 있는 검사실과 비교하고 더불어 현재 본원에서 사용하고 있는 화학발광 면역측정법(chemiluminescent immunoassay, CLIA)법과의 상관성(correlation) 및 일치도 평가를 통해 실제 임상에서 사용할 수 있는지 검증하고 국내 최초로 검사실에 도입하려 한다. 또한 임상에서 많이 쓰이는 프레드니솔론(prednisolone)과 교차반응(cross-reaction)이 일어나는지를 실험하였다.

II. 재료 및 방법

1. LC-MS/MS

분자량이 362.46 g/mol인 코르티솔을 측정하기 위해서 내부표준물질로 분자량이 366.48 g/mol인 Cortisol-d₄를 사용하였다. 전 처리는 SPE cartridge (Strata X C18-E 1000 mg/6mL, Strata X 33u polymeric reversed phase 30 mg/mL)를 이용한 고체상 추출(solid phase extraction, SPE) 법으로 시행하였다. 검사장비는 API 4000 (Applied Biosystems, Foster, USA)를 사용하였다. 이동상(mobile phase)으로 0.1% Formic acid in deionized water (D.W.)와 0.1% Formic acid in 95% Acetonitrile를 7:3의 비로 사용하였다. Calibrator는 blank urine을 제조한 후 코르티솔 (Hydrocortisone, 98.8%, Sigma)와 50 %, 100 % 메탄올 (CH₃OH, 99.9%, Fisher scientific)을 spiking하여 1 ng/ml, 5 ng/ml, 10 ng/ml, 50 ng/mL, 100 ng/ml, 500 ng/mL, 1,000 ng/mL 코르티솔을 제조하여 사용하였다. 질 관리(Quality control, QC)은 검사할 때마다 미리 제조하여 놓은 3 ng/mL (low), 400 ng/mL (mid), 800 ng/mL (high)의 QC 물질을 함께 측정함으로써 시행하였다. 이러한 검사법과 제조법을 구체적으로 서술하여 후첨하였다.

2. 검사평가

LC-MS/MS 에 의한 UFC 의 검사에 대한 평가는 Clinical and Laboratory Standards Institute guideline (CLSI)를 참조하여 진행하였다²⁰. LC-MS/MS 에 의한 UFC 의 일내 정밀도(Within-day precision)은 하루에 low, mid, high 농도의 QC 물질을 8회 측정하여 평균 값과 임의 오차(random error, RE), 변이계수(coefficient of variation, CV)) 값을 계산하였으며 일간 정밀도(between-day precision)은 20일 동안 하루에 2회 low, mid, high 농도의QC 물질을 측정하여 평균값과 우연 오차, 변이계수를 계산하였다. 정확도는 2가지 농도의 표준 물질(standard reference material, NIST SRM 971)을 이용하여 각각 하루에 4회 측정하여 얻은 평균값을 참값으로 나누어 계산하였다. 매트릭스 효과는 추출하지 않은 분석표준 물질용액의 측정값으로 공 시료만 추출한 후 분석표준물질을 첨가하여 구한 측정값을 나누어 구하였으며 추출 전과 후를 low, mid, high의 3가지 농도에서 3회 반복하여 측정하여 계산하였다. 또한 공정효율(process efficiency)은 추출하지 않은 분석 표준물질용액의 측정 값으로 공 시료에 분석 표준물질을 첨가한 후 추출한 액의 측정값을 나누어 구하는 것으로 역시 추출 전과 후를 low, mid, high의 3가지 농도에서 3회 반복하여 측정하여 계산하였다. 검체 안

정도(Stability)평가는 저 농도(low)와 고농도(high)의 두 가지 농도의 물질을 3개씩으로 분주한 후 실온에 5일 방치 후 측정하였고 같은 방법으로 5일간 냉장 보관 후 측정하여 계산하였다. 검출한계(Lower limit of detection, LLOD), 정량한계(Lower limit of quantification, LLOQ)는 0.5 ng/ml, 1 ng/ml, 1.5 ng/ml, 2 ng/ml, 2.5 ng/ml, 3 ng/ml 농도의 코르티솔을 4번 반복 측정하여 신호 대 잡음 비(signal to noise ratio (S/N))와 평균값, 변이계수, 표준편차(SD, standard deviation)를 평가하는 방법을 사용하였다.

3. 상관성 및 일치도 평가

현재 평가하고 있는 액체 크로마토그래피 질량분석법과 다른 검사실의 액체 크로마토그래피 질량분석법을 비교하기 위하여 쿠싱 증후군이 의심되거나 부신우연종(adrenal incidentaloma)이 발견되어 시행한 45명의 24시간 소변 검체 45개를 미국 ARUP Laboratory (<http://www.aruplab.com/>)에 보내어 LC-MS/MS 에 의한 UFC 를 비교하였으며 또한 현재본원에서 시행하고 있는 화학발광면역측정법과 비교하기 위해 ARUP에 보낸 환자의 검체 45개를 Beckman DxI (Beckman Coulter, Inc., CA, USA)를 이용하여 UFC 를 측정하여 Passing and Bablok 회귀분석 (Analyse-it Software, Leeds, UK)을 시행하여 비교하였다.

4. Interference 평가

임상에서 많이 사용되는 약물 중 프레드니솔론이 교차반응을 통해 액체 크로마토그래피 질량분석법과 화학발광면역측정법으로 측정한 유리코르티솔 결과에 얼마나 영향을 주는지 알아보기 위하여 유리코르티솔 3 ng/ml, 400 ng/ml, 800 ng/ml에 농도를 유치한 채로 각각 prednisolone 0 ng/ml, 500 ng/ml, 1000 ng/ml, 2000 ng/ml이 되도록 섞어 액체 크로마토그래피 질량분석법과 Beckman DxI로 측정하였다.

III. 결과

질량분석기의 기기 매개변수(instrument parameter)는 표 1과 같다.

표 1. MS/MS instrument parameter

Parameters	Cortisol	Cortisol-d ₄
Ion type	Electrospray positive ion mode	
Declustering potential (V)	66	58
Entrance potential (V)	10	10
Collision energy (V)	30	32
Collision cell exit potential (V)	6	6
Transition	m/z 363 to 121	m/z 367 to 121

정밀도 실험결과는 표 2, 3과 같았다.

표 2. Within-day precision

Parameters	low (3 ng/ml)	mid (400 ng/ml)	high (800 ng/ml)
Mean (ng/ml)	3.02	396.99	762.01
RE (%)	0.62	-0.75	-4.75
CV (%)	3.88	1.49	2.26

RE, random error; CV, coefficient of variation

표 3. Between-day precision

Parameters	low (3 ng/ml)	mid (400 ng/ml)	high (800 ng/ml)
Mean (ng/ml)	3.06	399.04	791.88
RE (%)	2.08	-0.24	-4.72
CV (%)	5.90	3.15	4.72

RE, random error; CV, coefficient of variation

일내 정밀도 실험의 변이계수는 low, mid, high 농도 모두 5% 미만이었으며 일간 정밀도에서 변이계수는 low 농도에서 5.90%, mid와 high 농도에서는 5% 미만이었다. 정확도 실험에서는 표 4와 같이 첫 번째 검체는 평균 1.93%의 오차를 보였고 두 번째 검체는 평균 3.62%의 오차를 보였다.

표 4. Evaluation of accuracy

Replicate	Sample 1	Sample 2
1	109.64 ng/ml	96.53 ng/ml
2	108.72 ng/ml	91.52 ng/ml
3	109.05 ng/ml	93.05 ng/ml
4	110.46 ng/ml	94.01 ng/ml
Average	109.47 ng/ml	93.78 ng/ml
Reference value	107.4 ng/ml	90.5 ng/ml
Accuracy	101.93%	103.62%

표 5, 6과 같이 매트릭스 효과는 low, mid, high 농도에서 각각 96.99%, 103.58%, 99.10%였으며 공정효율은 low, mid, high에서 각각 99.13%, 93.73%, 93.17% 였다.

표 5. Evaluation of matrix effect

Parameters	Low	Mid	High
Mean of blank urine spiked after extraction (ng/ml)	3.12	427.81	813.62
Mean of neat standard (ng/ml)	3.22	413.04	820.99
Matrix effect (%)	96.89	103.58	99.10

표 6. Evaluation of process efficiency

Parameters	Low	Mid	High
Mean of blank urine spiked before extraction (ng/ml)	3.04	391.23	772.08
Mean of neat standard (ng/ml)	3.06	417.39	828.66
Process efficiency (%)	99.35	93.73	93.17

검체안정성 실험결과는 표 7에 나타난 것처럼 한 검체를 제외하면 예상 값의 5% 이내였다.

표 7. Evaluation of stability

Temperature	Level	Aliquot	Concentration	% difference
Room temperature	Low	1	3.03 ng/ml	1.00%
		2	2.94 ng/ml	-2.00%
		3	3.24 ng/ml	8.00%
	High	1	797.37 ng/ml	-0.33%
		2	785.03 ng/ml	-1.87%
		3	803.82 ng/ml	0.48%
Refrigerated	Low	1	3.07 ng/ml	2.33%
		2	3.07 ng/ml	2.33%
		3	3.04 ng/ml	1.33%
	High	1	783.19 ng/ml	-2.10%
		2	785.65 ng/ml	-1.79%
		3	762.28 ng/ml	-4.72%

표 8에서 보인 것과 같이 농도 0.5 ng/ml 이상에서 신호 대 잡음 비가 모두 3이상으로 측정되어 검출한계는 0.5 ng/ml이 되었다. 정량한계 역시 0.5 ng/ml에서 변이계수가 12.38%로 20% 미만인 값으로 측정되어 0.5 ng/ml로 평가되었다.

표 8. Evaluation of Lower Limit of Detection, Limit of Quantification

Parameters	0.5 ng/ml	1 ng/ml	1.5 ng/ml	2 ng/ml	2.5 ng/ml	3 ng/ml
Mean (ng/ml)	0.54	1.04	1.51	2	2.5	2.93
SD	0.067	0.14	0.066	0.061	0.021	0.078
CV	12.38%	13.48%	4.38%	3.04%	0.83%	2.68%
Minimum S/N	3.1	8.5	13	13.3	19.5	26.5

S/N, signal to noise ratio; SD, standard deviation; CV, coefficient of variation

ARUP laboratory와 비교하였을 때 그림 1에서 보이는 것처럼 약 37%의 양성비례오차를 보였다.

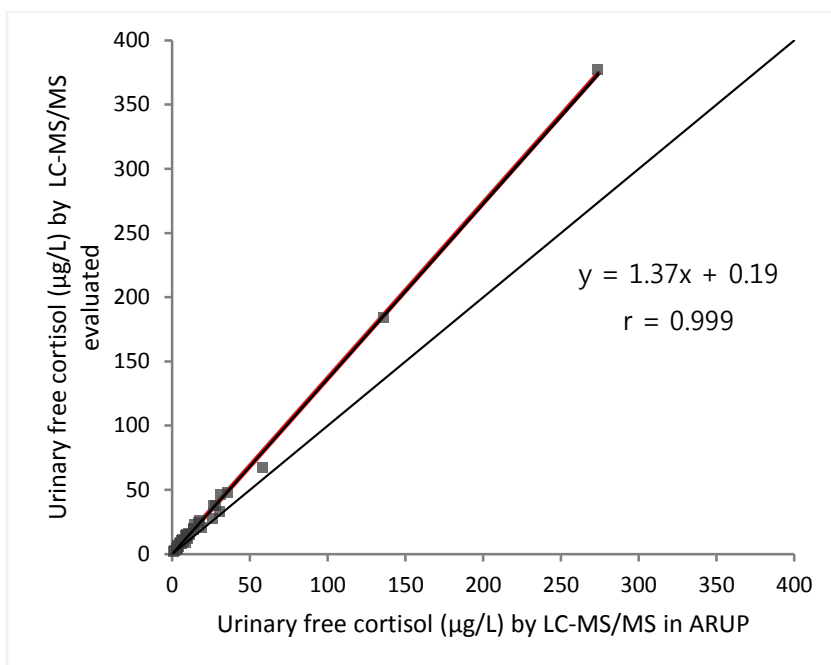


그림 1. Comparison of evaluated method and LC-MS/MS in ARUP.

화학발광면역측정법과 비교하였을 때는 그림 2에서 보이는 것처럼 화학발광면역측정법 결과가 현저하게 높은 값을 얻었다.

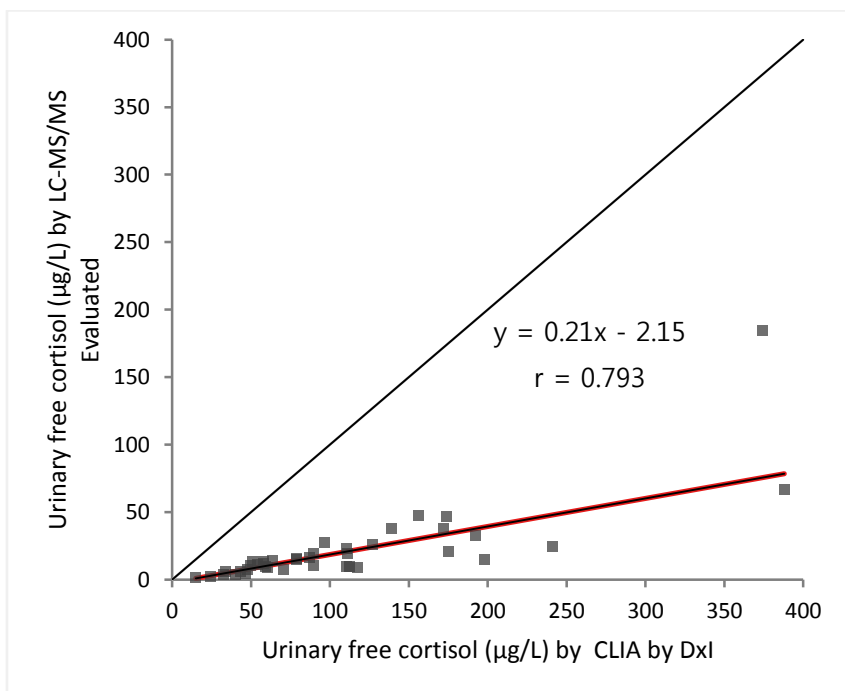


그림 2. Comparison of evaluated method and CLIA by DxI.

표 9에 프레드니솔론이 교차반응을 통해 액체 크로마토그래피 질량분석법과 화학발광면역 측정법으로 측정한 유리 코르티솔에 어느 정도 영향을 주는지 나타내었다.

표 9. Evaluation of interference of prednisolone

Cortisol (ng/mL)	Prednisolone (ng/mL)	By LC-MS/MS (ng/mL)	By CLIA (ng/mL)
3	0	3	4
	500	7.7	97
	1000	11.81	201
	2000	19.3	398
400	0	398.83	434
	500	419.43	604
	1000	418.88	788
	2000	436.86	884
800	0	802.34	1050
	500	815.29	1208
	1000	852.56	1151
	2000	819.53	1477

대부분의 검체에서 프레드니솔론이 증가함에 따라 코르티솔의 측정값 역시 증가하는 것을 확인할 수 있었으며 액체 크로마토그래피 질량분석법에서 화학발광면역 측정법보다 프레드니솔론의 간섭이 훨씬 적은 것을 관찰할 수 있었다.

IV. 고찰

저 분자 물질(small molecule)은 분자량 900 달톤(Dalton) 미만의 유기화합물을 지칭하는 것으로 대부분의 약물, 스테로이드 계통의 호르몬과 지질

(lipid), 알칼로이드(alkaloid), 글리코시드(glycoside)의 대사물이 이에 속한다²¹. 저 분자 물질을 정량 하는 방법으로 전통적으로 면역분석법이 쓰였으나 근래에는 대부분의 물질에서 액체 크로마토그래피 질량분석법이 표준방법(gold standard)으로 여겨지고 있다²². 면역분석법과 비교할 때, 액체 크로마토그래피 질량분석법이 갖는 장단점은 아래와 같다. 먼저, 대부분의 물질에서 민감하며 특이 하게 측정할 수 있다. 또한 한 번의 검사로 여러 가지 물질을 한 번에 측정할 수 있다. 그러나 자동화가 덜 되어 있어 검사실로의 도입이나 검사과정이 복잡하여 검사를 하는 데에 전문적인 인력이 필요하다. 그에 따라 사람에 의한 오차(human error)나 장소에 따른 차이(site-to-site variability) 혹은 기간에 따른 차이(period-to-period variability)가 나타날 수 있다. 또한 이온억제효과(ion suppression effect)를 제하기 위한 엄격한 평가가 필요하다²³.

액체 크로마토그래피 질량분석법은 크게 3가지 과정을 거친다. 고정상을 이용하여 검체의 매트릭스를 분리시키고 우리가 측정하고자 하는 물질을 가스상(gas phase)의 분자 이온으로 만든 후 단위전하 당 질량(mass to charge ratio (m/z)) 차이로 분리 검출하는 것이다. 이 때 검체의 전 처리방식이나 이온화(ionization)의 방법에 의해서 다양한 결과가 나올 수 있다^{19,24}. 본 연구에서는 고정상 추출을 사용하여 검체를 전 처리를 하며 전기분무 이온화(electrospray ionization (ESI))를 사용하여 검체를 이온화시켰다.

본 연구에서 사용한 전기분무 이온화 방법을 설명하자면, 분석하고자

하는 물질이 포함된 용액을 고전위가 걸린 가는 모세관을 통해 흘려 보내면 용액이 모세관 말단부를 통해 나올 때, 용액은 고 전위의 전기효과로 인해 많은 전하를 띤 작은 방울(droplet)의 안개를 만들어 내게 된다. 이 작은 방울이 질량 분석기기의 전위 및 압력 기울기 (potential and pressure gradient)를 따라 질량분석 기기의 도입부로 이동하게 된다. 이 과정에서 많은 양이온들로 인해 발생된 정전기력이 표면장력 이상으로 증가할 때 이차분열(secondary fission)을 통해 더 작은 방울로 변하게 되어 결국 단 분자 이온으로 변하게 되는 것이다²⁵⁻²⁷. 보통 무극 성 물질을 측정하고자 할 때, 대기압 화학적 이온화(atmospheric-pressure chemical ionization, APCI) 방법을 흔히 사용하지만^{28,29} 스테로이드에서는 전기분무 이온화 법 역시 검출률에는 차이가 없으며 부분적으로 민감도가 더 우수하다는 보고가 있어 본 연구에서는 전기분무 이온화 법을 사용하였다^{30,31}.

재현성(Precision)은 보통 변이계수(CV)로 표현하며 의학적 결정농도에서 이상적으로는 5%미만, 보통 10% 미만을 목표로 하게 된다³². 본 실험에서는 일내 정밀도의 변이계수 값은 모든 농도에서 5% 미만, 일간 정밀도에서 low 농도에서 5.05%, mid와 high 농도에서는 5% 미만으로 부정밀성(imprecision)이 산출되었다. 정확도는 소변을 기반으로 한 표준물질을 구할 수 없어 혈청(serum)을 기반으로 한 NIST SRM 971을 사용하였다. 정확도는 2가지 농도 모두에서 5% 미만의 퍼센트 오류(percentage error)를 보여 검증할 수 있었다.

매트릭스는 우리가 측정하고자 하는 물질을 제외한 미지 물질 중에 함유되어 있는 모든 화학 종을 뜻하며, 매트릭스 효과는 그 매트릭스로 인하여 발생하는 신호의 변화를 뜻한다³³. 매트릭스 효과의 평가는 검체를 추출하지 않은 채 측정한 결과를 순수한 표준 물질을 측정한 결과로 나누는 방법으로 한다^{34,35}. 본 실험에서 5%이내의 우수한 결과를 보였다. 더불어 공정 효율은 추출 한 후 측정한 결과를 순수한 표준 물질을 측정한 결과로 나누는 방법으로 평가하게 되는데 Mid와 High 농도에서 93% 정도로 추출 과정에서 적은 양일지라도 분석물질의 손실이 일어나는 것을 확인하였다.

질량분석기를 이용하는 검사에 있어서 검출한계와 정량한계를 설정해야 한다. 검출한계는 신호 대 잡음비가 3이상인 값으로 정하고 정량한계는 검출한계와 같거나 높은 값에서 변이계수가 20% 미만으로 측정되거나 신호 대 잡음비가 10이상일 때 설정할 수 있다²⁰. 본 연구에서는 위에서 보고한 6개의 농도 이외에 5 ng/ml, 7.5 ng/ml, 10 ng/ml, 12.5 ng/ml, 15 ng/ml의 5개 농도를 추가하여 총 11개 농도에서 검출한계와 정량한계를 실험하였고 0.5 ng/ml을 검출한계와 정량한계로 설정할 수 있었다. 이 중 정량한계의 경우 0.5 ng/ml에서 변이계수가 12.38%로 20% 미만으로 계산되어 0.5 ng/ml로 설정할 수 있었는데 신호 대 잡음비가 10 이상으로 계산되는 농도는 1.5 ng/ml이었다. 검체 안정성 평가에서는 검체를 5일간 실온과 냉장에서 보관한 후 측정하였을 때 큰 차이가 없었다. 실온에서 방치한 검

체 하나에서 8%의 차이를 보이기는 하였지만 절대값으로는 0.24 ng/ml 차이에 불과하여 임상적으로 사용 가능하다고 판단 하였다.

본 실험을 ARUP의 결과와 비교하였을 때, 37% 높은 비례오차가 있는 결과를 보였다(그림 2). 이 이유에 대해 세가지 가설을 세웠는데 ARUP에서는 고정상 추출 등으로 추출을 하지 않아 공정효율에서 차이가 날 수 있다는 것, 두 번째는 ARUP에서 사용한 이온화방식인 대기압 화학적 이온화와 본 실험의 이온화방식인 전기분무 이온화에서 차이가 날 수 있다는 것이었다. 마지막으로 세 번째는 본 실험의 보정물질(calibrator)와 질관리 물질이 변질되었다는 것이다. 첫째 가설은 표 4-2에서 보는 것처럼 검체의 손실이 있을 수는 있으나 37%만큼 크지는 않다는 점과 추가로 ARUP에 보낸 검체 중 19검체를 추출한 것과 하지 않은 것을 비교한 결과에서 3% 미만의 비례적인 차이를 보였으며(그림 3) 또한 Nassar 등이 보고한 연구에서 추출 없이도 추출하였을 때와 유사한 결과를 보인 바 있었기에³⁶ 기각할 수 있었다.

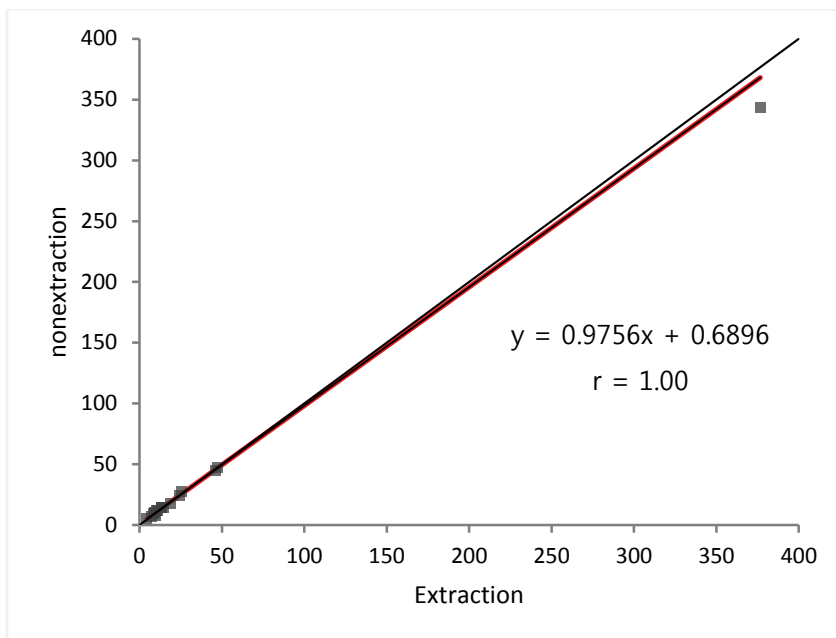


그림 3. Evaluation of loss of extraction for urinary free cortisol

두 번째 가설은 본 연구 방법에서 혈청 NIST SRM 971 물질로 확인한 결과 정확도가 우수하여 본 방법에서 사용한 전기분무 이온화 검출기의 문제는 없었을 것으로 사료되며 이러한 차이가 검출기의 차이에 의한 가능성이 있을 것이다. 셋째 가설은 보정물질(calibrator)와 질 관리 물질을 다시 만듦으로써 그 변질이 아님을 확인할 수 있다. 한편, NIST 물질로 혈청 검체를 확인한 결과 정확도는 우수하였다.

본 방법의 결과는 화학발광면역측정법을 사용하고 있는 DxI와 비교하였을 때 약 20% 정도로 낮은 값을 보였는데 이것은 Wood 등이 항원-항체

반응에 의한 간섭이나 교차반응이 원인이라고 보고된 바 있다²⁴. 표 11에 나타낸 것은 본 연구에서 평가하고 있는 액체 크로마토그래피 질량분석법, ARUP 검사실의 액체 크로마토그래피 질량분석법 그리고 화학발광면역측정법의 결과를 비교한 45명중 의원성(iatrogenic) 쿠싱증후군 혹은 약 중단 이후의 부신기능부전이 의심된 3명의 환자의 결과인데 이 결과들에서 화학발광면역측정법에서 액체 크로마토그래피 질량분석법보다 10배이상 높은 결과를 보였다는 점이 또 다른 근거가 될 것이다.

표 10. Measurements of Urinary Free Cortisol (UFC) of patients with iatrogenic Cushing's syndrome by three methods

	UFC by current LC-MS/MS Method ($\mu\text{g/day}$)	UFC by LC-MS/MS in ARUP Lab ($\mu\text{g/day}$)	UFC by DxI immunoassay ($\mu\text{g/day}$)
Patient 1	2.2	2.0	28.2
Patient 2	3.2	<1	95.92
Patient 3	<1	<1	11.84

상기 3명의 환자 중 1명이 사용한 프레드니솔론을 이용하여 교차반응 실험을 하였다. 프레드니솔론은 화학발광면역측정법 등의 면역학적 방법에 교차반응을 보여 양성오차를 보인다고 보고된 바 있다^{37,38}. 그러나 액체 크로마토그래피 질량분석법에서 각각의 스테로이드들이 얼마나 교차반응을 일으키는지 보고된 바가 거의 없다. 본 연구에서 보인 액체 크로

마토그래피 질량분석법에서의 교차반응율은 화학발광면역측정법에서의 교차반응율의 10% 수준으로 우수한 것으로 나타났으며 액체 크로마토그래피 질량분석법을 이용하여 여러 분석물질을 동시에 정량할 수 있다는 장점을 이용하여 실제 임상에서 부신기능부전 환자의 순수 코티졸 배출량을 구할 수 있을 것이다.

V. 결론

이상과 같이 정밀도, 정확도, 매트릭스 효과, 검체안정도, 검출한계, 정량한계 그리고 상관성을 검증하는 과정을 거쳐 본 검사실에 실제로 도입하기 위한 평가를 마쳤다. 이는 쿠싱증후군을 진단하는데 유용할 뿐만 아니라 쿠싱증후군의 가장 흔한 원인인 의인성 쿠싱증후군의 환자를 치료하는 과정에서 겪게 되는 스테로이드 약물 사용 중단 시점의 결정의 등의 임상의 어려움을 해결하는 데에 큰 도움이 될 것이다.

참고문헌

1. Newell-Price J, Bertagna X, Grossman AB, Nieman LK. Cushing's syndrome. *Lancet* 2006;367:1605-17.
2. Findling JW, Raff H. *J Clin Transl Endocrinol* 2006;91:3746-53.
3. Sharma ST, Nieman LK. Cushing's syndrome: all variants, detection, and treatment. *Endocrinol Metab Clin North Am* 2011;40:379-91.
4. Raff H, Findling JW. A physiologic approach to diagnosis of the Cushing syndrome. *Ann Intern Med* 2003;138:980-91.
5. Lindholm J, Juul S, Jorgensen JO, Astrup J, Bjerre P, Feldt-Rasmussen U, et al. Incidence and late prognosis of cushing's syndrome: a population-based study. *J Clin Endocrinol Metab* 2001;86:117-23.
6. Ross NS. Epidemiology of Cushing's syndrome and subclinical disease. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1994;23:539-46.
7. Plotz CM, Knowlton AI, Ragan C. The natural history of Cushing's syndrome. *Am J Med* 1952;13:597-614.
8. Chan S, Debono M. Replication of cortisol circadian rhythm: new advances in hydrocortisone replacement therapy. *Ther Adv Endocrinol Metab* 2010;1:129-38.
9. Tourniaire J, Chalendar D, Rebattu B, Fevre-Montange M, Bajard L, Mazenod B, et al. The 24-h cortisol secretory pattern in Cushing's syndrome. *Acta Endocrinol (Copenh)* 1986;112:230-7.

10. Meier CA, Biller BM. Clinical and biochemical evaluation of Cushing's syndrome. *Endocrinol Metab Clin North Am* 1997;26:741-62.
11. Nieman LK, Biller BM, Findling JW, et al. The diagnosis of Cushing's syndrome: an Endocrine Society Clinical Practice Guideline. *J Clin Endocrinol Metab* 2008;93:1526-40.
12. Nahoul K, Patricot MC, Moatti JP, Revol A. Determination of urinary cortisol with three commercial immunoassays. *J Steroid Biochem Mol Biol* 1992;43:573-80.
13. Schoneshofer M, Fenner A, Dulce HJ. Interferences in the radioimmunological determination of urinary free cortisol. *Clin Chim Acta* 1980;101:125-34.
14. Murphy BE, Okouneff LM, Klein GP, Ngo SC. Lack of specificity of cortisol determinations in human urine. *J Clin Endocrinol Metab* 1981;53:91-9.
15. Horie H, Kidowaki T, Koyama Y, et al. Specificity assessment of immunoassay kits for determination of urinary free cortisol concentrations. *Clin Chim Acta* 2007;378:66-70.
16. Fink RS, Pierre LN, Daley-Yates PT, Richards DH, Gibson A, Honour JW. Hypothalamic-pituitary-adrenal axis function after inhaled corticosteroids: unreliability of urinary free cortisol estimation. *J Clin Endocrinol Metab* 2002;87:4541-6.
17. Findling JW, Pinkstaff SM, Shaker JL, Raff H, Nelson JC. Pseudohypercortisoluria: Spurious Elevation of Urinary Cortisol due to Carbamazepine. *The Endocrinologist* 1998;8:51-4.
18. Turpeinen U, Markkanen H, Valimaki M, Stenman UH. Determination of

urinary free cortisol by HPLC. Clin Chem 1997;43:1386-91.

19. Soldin SJ, Soldin OP. Steroid hormone analysis by tandem mass spectrometry. Clin Chem 2009;55:1061-6.

20. Clinical and Laboratory Standards Institute. Mass Spectrometry in the Clinical Laboratory: General Principle and Guidance; Approved Guideline, CLSI document C-50A. Wayne PA: Clinical and Laboratory Standards Institute, 2007.

21. Macielag MJ (2012). Chemical properties of antibacterials and their uniqueness. In Dougherty TJ, Pucci MJ. Antibiotic Discovery and Development. pp. 801–2.

22. Handelsman DJ, Wartofsky L. Requirement for mass spectrometry sex steroid assays in the Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism. J Clin Endocrinol Metab 2013;98:3971-3.

23. Brandhorst G, Oellerich M, Maine G, Taylor P, Veen G, Wallemacq P. Liquid chromatography-tandem mass spectrometry or automated immunoassays: what are the future trends in therapeutic drug monitoring? Clin Chem 2012;58:821-5.

24. Wood L, Ducroq DH, Fraser HL, et al. Measurement of urinary free cortisol by tandem mass spectrometry and comparison with results obtained by gas chromatography-mass spectrometry and two commercial immunoassays. Ann Clin Biochem 2008;45:380-8.

25. Fenn JB. Ion formation from charged droplets: Roles of geometry, energy, and time. J Am Soc Mass Spectrom 1993;4:524-35.

26. Kebarle P, Tang L. From ions in solution to ions in the gas phase-the mechanism of electrospray mass spectrometry. Anal Chem 1993;65:972A-86A.

27. Fenn JB, Mann M, Meng CK, Wong SF, Whitehouse CM. Electrospray ionization—principles and practice. *Mass Spectrom Rev* 1990;9:37-70.
28. Carroll D, Dzidic I, Stillwell R, Haegele K, Horning E. Atmospheric pressure ionization mass spectrometry. Corona discharge ion source for use in a liquid chromatograph-mass spectrometer-computer analytical system. *Anal Chem* 1975;47:2369-73.
29. Richardson SD. The role of GC-MS and LC-MS in the discovery of drinking water disinfection by-products. *J Environ Monit* 2002;4:1-9.
30. Ma Y-C, Kim H-Y. Determination of Steroids by Liquid Chromatography/Mass Spectrometry. *J Am Soc Mass Spectrom* 1997;8:1010-20.
31. Kuuranne T, Vahermo M, Leinonen A, Kostianen R. Electrospray and atmospheric pressure chemical ionization tandem mass spectrometric behavior of eight anabolic steroid glucuronides. *J Am Soc Mass Spectrom* 2000;11:722-30.
32. NCCLS. Evaluation of Precision Performance of Quantitative Measurement Methods; Approved Guideline—Second Edition. NCCLS document EP5-A2 [ISBN 1-56238-542-9]. NCCLS, 940 West Valley Road, Suite 1400, Wayne, Pennsylvania 19087-1898 USA, 2004.
33. IUPAC, Compendium of Chemical Terminology, 2nd ed., 1997
34. Annesley TM. Ion suppression in mass spectrometry. *Clin Chem* 2003;49:1041-4.
35. Matuszewski BK, Constanzer ML, Chavez-Eng CM. Strategies for the assessment of matrix effect in quantitative bioanalytical methods based on HPLC-

MS/MS. Anal Chem 2003;75:3019-30.

36. Nassar AE, Varshney N, Getek T, Cheng L. Quantitative analysis of hydrocortisone in human urine using a high-performance liquid chromatographic-tandem mass spectrometric-atmospheric-pressure chemical ionization method. J Chromatogr Sci 2001;39:59-64.

37. Taylor RL, Machacek D, Singh RJ. Validation of a high-throughput liquid chromatography-tandem mass spectrometry method for urinary cortisol and cortisone. Clin Chem 2002;48:1511-9.

38. Monaghan PJ, Keevil BG, Trainer PJ. The use of mass spectrometry to improve the diagnosis and the management of the HPA axis. Rev Endocr Metab Disord 2013;14:143-57.

부록

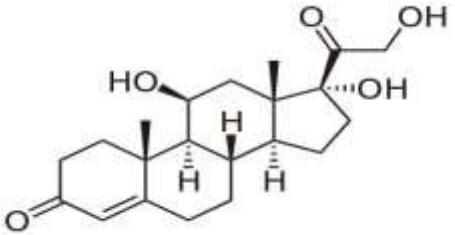
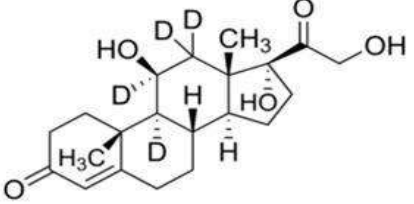
LC-MS/MS를 이용한 Urinary Free Cortisol 측정 Manual

1. 기본사항

가. 검사원리: 질량 분석기를 이용한 이온의 변화 측정

나. 검체 종류 및 최소 검체 량 : Urine 600 μ l

다. Compound information

Compound	Structure	weight	Formula
Cortisol		362.460 [g/mol]	C ₂₁ H ₃₀ O ₅
ISTD Cortisol d4 (9,11,12,12)		366.48 [g/mol]	C ₂₁ D ₄ H ₂₆ O ₅

(1) Analyte: Cortisol

(2) Internal Standard: Cortisol d4

2. 시약제조

가. Mobile phase 제조에 필요한 장비, 화학 물질과 그 외 다른 재료들

(1) 모든 pipette과 volumetric flask는 따로 명시되지 않은 이상 Class A glassware을사용한다.

(가) Volumetric flask – 1000 mL 2개

(나) Automatic pipette

(다) Automatic pipette tip (1.0 mL)

(라) Beaker

(2) 화학물질과 시약

(가) Formic acid (CH_2O_2 , 98%, Sigma)

(나) Acetonitile (CH_3CN , 99.9%, Merck)

(다) Deionized water (dH_2O)

나. Mobile phase 제조

(1) 구성(A : B = 70:30)

A: 0.1% Formic acid in dH₂O

B: 0.1% Formic acid in 95% Acetonitrile

(2) Mobile phase A 제조

1000 mL volumetric flask에 1000 mL가 되지 않도록 DW를 채운 다음 automatic pipette을 이용해 formic acid 1.0 mL을 떨어뜨린다. 그 후 automatic pipette으로 dH₂O 를채워 1000 mL을 만든다.
이것을 mobile phase A라 칭한다.

(3) Mobile phase B 제조

1000 mL volumetric flask에 automatic pipette을이용하여 dH₂O 49mL을 넣은 다음 automatic pipette을이용해 formic acid 1.0 mL을 떨어뜨린다. 그 후 acetonitrile로 1000 mL을 채운다. 이때 Beaker를 이용하여 1000 mL이 되지 않게 채운 다음 automatic pipette으로 acetonitrile을 채워 1000 mL을 만든다
이것을 mobile phase B라 칭한다.

다. Calibrator 제조에 필요한 장비, 화학 물질과 그 외 다른 재료들

(1) 모든 pipette과 volumetric flask는 따로 명시되지 않은 이상 Class A glassware을 사용한다.

(가) Volumetric flask – 100 mL 1개, 50 mL 7개

(나) Volumetric pipette – 5 mL 7개

(다) Automatic pipette

(라) Automatic pipette tip (1.0 mL)

(마) Ultrasonic bath (sonorex, Bandelin electronic)

(바) Analytical balance – Analytical capable of weighing 0.0001g

(사) Weighing paper

(2) 화학 물질과 시약

(가) Cortisol (Hydrocortisone, 98.8%, Sigma) – 10.12 mg

(나) Methanol (CH_3OH , 99.9%, Merck) - 50%, 100%

라. Calibrator 준비방법

(1) Stock solution (100 μ g/mL 용액 100 mL) 제조

(가) Cortisol 10.12 mg을 analytical balance로 측정한다.

이 때 저울의 전원을 켜 후 저울의 접시 좌우의 문을 연다. 준비된 솔로 저울의 접시 주변을 청소한다. Weighing paper를 삼각형으로 2번 접어 깔때기 모양으로 만든 다음 저울의 접시에 올린 후 접시 좌우의 문을 닫고 영점을 잡는 버튼을 누른다. 그 후 다시 접시 좌우의 문을 열고 weighing paper에 작은 스푼으로 cortisol powder를 떨어트린다. 10.12 mg이 되면 접시 좌우의 문을 닫고 확인한다.

(나) 측정한 cortisol을 100 mL volumetric flask에 털어 넣는다.

이때 cortisol powder가 다른 곳으로 떨어지지 않게 weighing paper의 접은 부분을 이용하여 조심스럽게 털어 넣는다. Weighing paper에서 powder가 다 떨어지지 않는다면 automatic pipette에 1.0 mL tip을 끼운 후 100% methanol을 weighing paper에 흘리는 방법을 사용할 수 있다.

(다) 100 mL volumetric flask에 100% methanol을 채워 넣는다.

이때 volumetric flask의 선과 눈높이를 같게 하여 100 mL이 정확히 되도록 한다.

(라) Ultrasonic bath를 10초 이상 사용하여 cortisol을 methanol에 완전히 녹인다.

농도 100 mcg/mL용액 100 mL이 만들어진다.

이것을 stock solution이라 칭한다.

(2) Calibrator (S1~S7) 제조

(가) stock solution에서 5 mL을 덜어서 50 mL volumetric flask에 넣는다.

이때 volumetric pipette을 사용한다. Volumetric pipette을 사용할 때 눈높이를 pipette과 맞추어 정확한 용량이 되도록 하여야 한다.

이후, 50% methanol 45 mL를 50 mL volumetric flask에 넣어서 10 μ g/mL용액 50 mL을 만든다.

이것을 임의로 S8이라 칭한다.

이때 50 mL을 정확히 맞추기 위하여 automatic pipette을 이용한다.

(나) S8에서 5 mL를 덜어서 50 mL volumetric flask에 넣는다. 이때 volumetric pipette을 사용한다. Volumetric pipette을 사용할 때 눈높이를 pipette과 맞추어 정확한 용량이 되도록 하여야 한다. 이후, 50% methanol 45 mL를 50 mL volumetric flask에 넣어서 1,000 ng/mL 용액 50 mL을 만든다.

이것을 S7이라 칭한다.

이때 50 mL을 정확히 맞추기 위하여 automatic pipette을 이용한다.

(다) S7에서 25 mL을 덜어서 50 mL volumetric flask에 넣는다. 이때 volumetric pipette을 사용한다. 그 후 50% methanol 25 mL를 50 mL volumetric flask에 넣어서 500 ng/mL 용액 50 mL을 만든다. 50 mL을 정확히 맞추기 위하여 automatic pipette을 이용한다.

이것을 S6이라 칭한다.

(라) S7에서 5 mL을 덜어서 50 mL volumetric flask에 넣는다. 이때 volumetric pipette을 사용한다. 그 후 50% methanol 45 mL를 50 mL volumetric flask에 넣어서 100 ng/mL 용액 50 mL을 만든다. 50 mL을 정확히 맞추기 위하여 automatic pipette을 이용한다.

이것을 S5이라칭한다.

(마) S6에서 5 mL을 덜어서 50 mL volumetric flask에 넣는다. 이때 volumetric pipette을사용한다. 그 후 50% methanol 45 mL를 50 mL volumetric flask에 넣어서50ng/mL용액 50 mL을만든다. 50 mL을 정확히 맞추기 위하여 automatic pipette을 이용한다.
이것을 S4이라칭한다.

(바) S5에서 5 mL을 덜어서 50 mL volumetric flask에 넣는다. 이때 volumetric pipette을사용한다. 그 후 50% methanol 45 mL를 50 mL volumetric flask에 넣어서10 ng/mL용액 50 mL을만든다. 50 mL을 정확히 맞추기 위하여 automatic pipette을 이용한다.
이것을 S3이라칭한다.

(사) S4에서 5 mL을 덜어서 50 mL volumetric flask에 넣는다. 이때 volumetric pipette을사용한다. 그 후 50% methanol 45 mL를 50 mL volumetric flask에 넣어서 5ng/mL용액 50 mL을 만든다. 50 mL을 정확히 맞추기 위하여 automatic pipette을이용한다.
이것을 S2이라칭한다.

(아) S3에서 5 mL을 덜어서 50 mL volumetric flask에 넣는다. 이때 volumetric pipette을 사용한다. 그 후 50% methanol 45 mL를 50 mL volumetric flask에 넣어서 1 ng/mL 용액 50 mL을 만든다. 50 mL을 정확히 맞추기 위하여 automatic pipette을 이용한다.
이것을 S1이라 칭한다.

(3) 보관방법: 1 mg/mL stock solution과 제조한 Q.C는 -70℃ deep freezer 에 보관하고 그 외 working solution 은 -30℃ 냉동고에 보관한다.

마. Blank urine 제조방법

(1) Pre-flow 과정

(가) Cartridge와 needle, glass tube를 manifold에 장착한 뒤 100% methanol 5 mL를 automatic pipette을 이용해 cartridge 내에 분주한다.

이때, 장착 과정은 다음과 같다

① sampling 할 위치를 정하고 그에 맞게 glass tube 를 설치한다.

- ② sampling 할 위치를 제외한 나머지 위치는 음압을 걸어주었을 시, vacuum이 새지 않도록 마개로 잘 막아준다.
- ③ sampling 할 위치에 needle 을 장착 후 그에 상응하는 hole 에 cartridge 를 장착한다.
- ④ needle 이 glass tube 안에 잘 들어가도록 하여 plate (cartridge와 needle이 장착된 판)를 덮는다.

(나) manifold vacuum을이용하여 -20 kPa만큼의 음압을 걸어 60초동안 분주한 methanol이 cartridge를 통과되도록 한다.

이때, manifold vacuum 사용방법은 아래와 같다.

- ① 설치가 끝난 manifold vacuum 을 사용 전, 마개가 잘 장착되었는지 확인한다. (vacuum이 빠지지 않게 하기 위한 작업임.)
- ② 음압기 스위치를 ‘ON’ 하여 sample이 잘 내려가는지 확인한다. (이때, 음압계 수치가 -20 kpa가 넘지 않는지 확인하고, 만약 조정이 필요하면 장비에 연결되어 있는 호스의 압력 조절기를 이용하여 조절한다.)
- ③ flow 과정이 끝나면 스위치를 ‘OFF’로 전환한다.

(다) 아래에 설치한 Glass tube에떨어진 waste를 제거하고 dH₂O 5 mL

를 automatic pipette을 이용해 cartridge내에 분주한다.

- (라) manifold vacuum을 이용하여 -20 kPa만큼의 음압을 걸어 60초 동안 분주한 dH₂O 가 cartridge를 통과되도록 한다.

(2) Sampling 과정

- (가) 새로운 glass tube를 manifold에 장착하고 urine sample 5 mL를 cartridge내에 분주한다.

- (나) manifold vacuum을 이용하여 -20 kPa, 60초동안 cartridge를 통과시킨다.

3. 검사방법 - 전처리

- 가. 전처리(Liquid chromatography)에 필요한 장비, 화학 물질과 그 외 다른 재료들

- (1) 모든 pipette과 volumetric flask는 따로 명시되지 않은 이상 Class A glassware을 사용한다.

- (가) SPE cartridge (Strata X C18-E 1000 mg/6mL, Strata X 33u polymeric reversed phase 30 mg/mL)
- (나) Manifold vacuum (GAST, GAST manufacturing INC.)
- (다) Automatic pipette
- (라) Automatic pipette tip (Eppendorf)
- (마) Glass tube (대한과학)
- (바) Vortex mixer (Vortex-GENIE2, Scientific Industries)
- (사) Micro centrifuge (Centrifuge 5415R, Eppendorf)
- (아) 1.5 mL microtube (AXYGEN)
- (자) Screw caps 300 μ L (Infochroma)
- (차) Screw cap vials 300 μ L (screw Top, Microsolv Technology)
- (카) Evaporator (RapidVap N2 Evaporation Systems, Labconco)

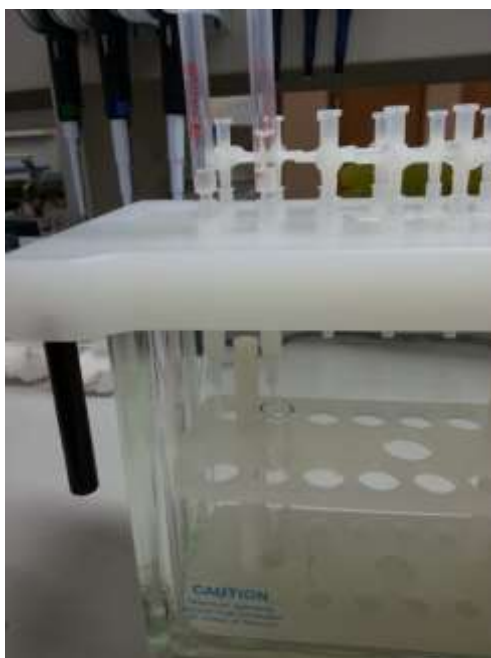
(2) 화학 물질과 시약

- (가) Methanol (CH_3OH , 99.9%, Merck) – 40%, 50%, 100%
- (나) Acetonitrile (CH_3CN , 99.9%, Merck) – 40%
- (다) Distilled water

나. SPE 방법

(1) Pre-flow 과정

(가) Cartridge와 needle, glass tube를 manifold에 아래 사진과 같이 장착한 뒤 100% methanol 5 mL를 automatic pipette을 이용해 cartridge 내에 분주한다.



이때, 장착 과정은 다음과 같다

- ① sampling할 위치를 정하고 그에 맞게 glass tube 를 설치한다.
- ② sampling 할 위치를 제외한 나머지 위치는 음압을 걸어주었을 시, vacuum이 새지 않도록 마개로 잘 막아준다.

③ sampling 할 위치에 needle을 장착 후 그에 상응하는 hole
에 cartridge 를 장착한다.

④ needle 이 glass tube 안에 잘 들어가도록 하여
plate(cartridge와 needle이 장착된 판)를 덮는다.

(나) manifold vacuum을 이용하여 -20 kPa만큼의 음압을 걸어 60초 동
안 분주한 methanol이 cartridge를 통과 되도록 한다.

이때, manifold vacuum 사용 방법은 아래와 같다.

① 설치가 끝난 manifold vacuum 을사용전, 마개가 잘 장착되
었는지 확인한다. (vacuum이 빠지지 않게 하기 위한 작업
임.)

② 음압기 스위치를 ‘ON’ 하여 sample이 잘 내려가는지 확인
한다. (이때, 음압계 수치가 -20 kpa가 넘지 않는지 확인하
고, 만약 조정이 필요하면 장비에 연결되어있는 호스의
압력조절기를 이용하여 조절한다.)

③ flow 과정이 끝나면 스위치를 ‘OFF’로 전환한다.

(다) dH₂O 1ml를 automatic pipette을 이용해 cartridge내에 분주한다.

(라) manifold vacuum을 이용하여 -20 kPa만큼의 음압을 걸어 60초동

안 분주한 dH₂O 가 cartridge를 통과되도록 한다.

(2) Sampling 과정

(가) urine sample 500 μ L를 cartridge 내에 분주한다.

(나) manifold vacuum을 이용하여 -20 kPa, 60초 동안 cartridge를 통과시킨다.

(3) Washing 과정

(가) D.W. 500 μ L를 automatic pipette을 이용해 cartridge 내에 분주한다.

(나) manifold vacuum을 이용하여 -20kPa, 60초 동안 cartridge를 통과시킨다.

(다) 40% MeOH 500 μ L를 automatic pipette을 이용해 cartridge내에 분주한다.

(라) manifold vacuum을 이용하여 -20kPa, 60초동안 cartridge를 통과시킨다.

(4) Elution 과정

(가) 기존의 glass tube를 manifold에서 제거한 뒤 새로운 glass tube에 labeling한 뒤 장착한다.

(나) 100% methanol 500 μ L를 cartridge내 분주한다.

(다) manifold vacuum을 이용하여 -10kPa, 60초동안 cartridge를 통과시킨다.

(5) Evaporation 과정

(가) Elution된 용액이 담긴 tube를 evaporator로 methanol를 40-60분동안 evaporation 시킨다.

(나) 이때, evaporator 사용방법은 아래와 같다.

- ① 사용 전 장비를 예열해주기 위해 pre-heat 버튼을 눌러준다. (약 65℃ / 30분)
- ② sample의 개수에 따라 SAMPLE 버튼을 이용하여 ‘2, 4, 6, 8’을 조정한다. (‘2, 4, 6, 8’은 Active N₂positions을 의미하며, 각각 1 rack 당 6 개의 position을 갖는다.)
- ③ 위치에 맞게 glass tube 를 장착한 후 뚜껑을 닫고 START/STOP 버튼을 눌러준다.

(6) Reconstitution 과정

(가) Evaporation이 끝난 tube에 40% ACN을 100 μ L분주 한다.

(나) 30-60초동안 vortexing시킨다.

(7) Centrifuging 과정

(가) automatic pipette을 이용하여 1.5 mL micro tube에 90 μ L를 옮긴 뒤 micro centrifuge에 5분동안 13000 rpm로 centrifuge한다.

(8) Bottle 과정

(가) automatic pipette을 이용하여 70 μ L를취해서 screw cap bottle에 옮긴 뒤 뚜껑을 닫고 바닥의 bubble을 제거한다. 이때, 뚜껑을 닫은 후 손을 이용하여 bottle 바닥을 힘차게 쳐 주면서 육안으로 bubble이 제거 되는지 확인한다.

4. 검사방법 – LC/MS/MS를 이용한 분석 과정

가. 검사장비

(1) LC/MS/MS System (API 4000)

나. LC condition

- (1) Flow rate: 600 $\mu\text{l}/\text{min}$
- (2) Isocratic : (A : B = 70 : 30)
- (3) Injection volume: 2 μl

다. Mass Condition

	DP	EP	CE	CXP
Analyte	66.0	10.0	30.0	6.0
Internal standard	58.0	10.0	32.0	6.0

- (1) Analyte : Cortisol (m/z: 363/121)
- (2) Internal standard : Cortisol d4 (m/z: 367/121)
- (3) Spray ion Voltage : 5500 V
- (4) Curtain gas : 30.0
- (5) Temperature: 500.0 $^{\circ}\text{C}$
- (6) Gas 1 : 60.0
- (7) Gas 2 : 60.0
- (8) CAD : Medium

라. LC/MS/MS 이용법

- (1) 벽면의 Exhaust와 Gas 1,2 스위치를 12시방향으로 올리고 장비를 켜다.
- (2) 이 검사에 해당하는 Mobile Phase와 Column을 준비한다.
- (3) 준비된 Sample을 Rack에 넣은 후 LC장비에 장착한다.
- (4) “Analyte Software” 프로그램을 실행한다.
- (5) 실행 후 왼쪽 Menu에서 [Configure] – [Hardware Configuration]을 click한다.
- (6) [Hardware Configuration Editor] 팝업 창이 뜨면 [Hardware Profile:]의 하위메뉴에 [LCMS]를 click 하고 [Activate Profile] 버튼을 click 하여 LC 장비를 실행시킨다.
- (7) 검사 방법과 같은 조건으로 Mobile Phase로 line 과 column을 5분간 Prime 시킨 후, Flow rate를 0.00 mL/min으로 수정한 다음 Mass 장비에 연결한다.
- (8) 왼쪽 Menu에 [Acquire]을 click한 후, 도구모음에서 [Equilibrate] 버튼을 click하고 해당 검사의 Method를 지정한 다음 40분간 진행한다.
- (9) 왼쪽 Menu에 [Acquire] – [Build Acquisition Batch]를 click 하여 검

사를 진행할 Batch를만든다.

- (10) [Sample]에서 각각 [Set], [Quantitation], [Acquisition]에 해당 검사에 맞는 프로그램을 설정한 후 Rack에 현재 위치한 Sample에 맞는 [Sample name]을 설정한다.
- (11) [Location]에서 Rack에 위치한 Sample의 위치를 지정해준다.
- (12) [Quantitation]에서 각각 Sample (calibrator, Q.C.)의 농도를 지정해 준다. (단, 실제환자 Sample은 농도를 지정해 주지 않는다: 0.00*)
- (13) [Submit]에서 측정하고자 하는 Sample을 click한 후 오른쪽상단에 (Submit) 버튼을 click한다.
- (14) 측정하고자 하는 모든 Sample이 “Submit” 상태임을 확인한 후, 최종적으로 도구모음에서 [Start Sample] 버튼을 click하여 검사를 진행한다.
- (15) 왼쪽 Menu에 [Explore]에서 측정하고자 하는 물질의 peak area와 Retention time을확인한다.
- (16) 검사 종료 후 [Quantitate] – [Quantitation Wizard]를 실행하여 정량 분석하여 보고한다.
- (17) 측정이 끝난 column은 연결을 해제한 후 마개로 column 양쪽을 막아 실온에 보관한다.

ABSTRACT

Measurement of 24-h urine free cortisol using LC-MS/MS

Hyunmin Koo

Department of Medicine

The Graduate School, Yonsei University

(Directed by Professor Jeong-Ho Kim)

Introduction The urinary free cortisol (UFC) has generally been determined by immunoassay. However, immunoassay is known to be nonspecific with cross reaction and inaccuracy. Liquid chromatography combined with tandem mass spectrometry (LC-MS/MS) was used and evaluated for accurate determination of UFC.

Material and methods Within-day and between-day precision of UFC determination were evaluated with 8 times a day for 20 days, respectively. Accuracy of UFC was evaluated using NIST standard reference material. Matrix effect, stability, lower limit of detection and lower limit of quantification were also evaluated. We compared UFC values of 45 24-h urine specimens, among by LC-MS/MS of ARUP lab and DxI chemiluminescent immunoassay. Cross-reaction of

prednisolone was also evaluated.

Results Imprecision of within-day and between-day precision of UFC were below 10%. Bias of UFC was below 5%. Matrix effect and stability of UFC were verified. Lower limit of detection and lower limit of quantification of UFC were 1 ng/mL. There was positive proportional bias of UFC by our method comparing with those by LC-MS/MS of ARUP lab but showed good correlation ($y = 1.37x + 0.19$, $r = 0.999$). Cross-reaction of UFC by our method with prednisolone was about one tenth comparing to that by chemiluminescent immunoassay.

Conclusion UFC determination by LC-MS/MS showed good precision, sensitivity, accuracy with good specificity over prednisolone seemed to be useful for the diagnosis Cushing's syndrome.

Key words: LC-MS/MS, urinary free cortisol, Cushing's syndrome